

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C12N 15/12, C07K 15/00 C12P 21/08, C12Q 1/68 C12N 1/21, G01N 33/53, 33/574 C12P 19/34	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/00430 (43) Date de publication internationale: 7 janvier 1993 (07.01.93)
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00589  
(22) Date de dépôt international: 25 juin 1992 (25.06.92)

(30) Données relatives à la priorité:  
91/07807 25 juin 1991 (25.06.91) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (SNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PERBAL, Bernard [FR/FR]; 1, boulevard Beethoven, F-78280 Guyancourt (FR). MARTINERIE, Cécile [FR/FR]; 153, chemin de la Hunière, F-91120 Palaiseau (FR).

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).

## Publiée

Avec rapport de recherche internationale.  
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES HYBRIDIZABLE WITH THE NOV GENE OF CHICKENS

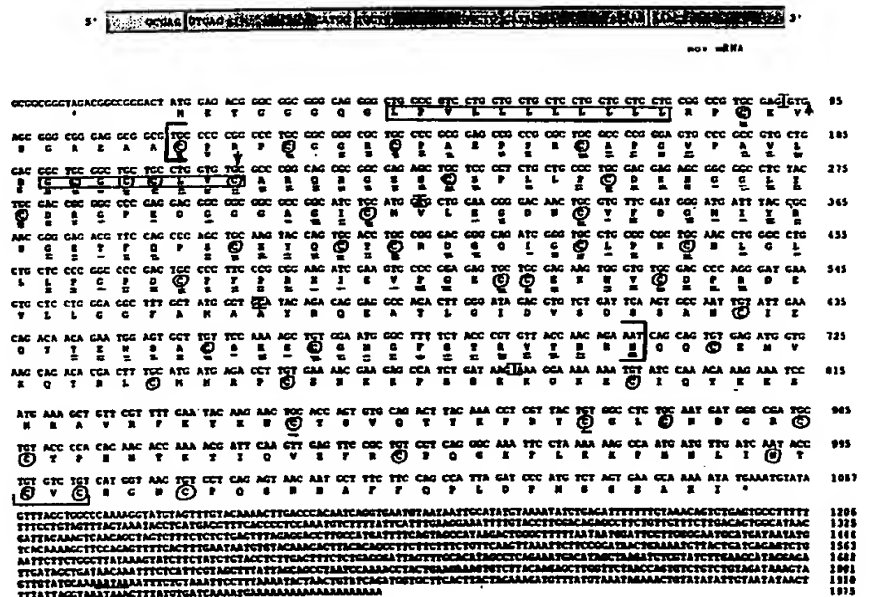
(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CAPABLES DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

## (57) Abstract

Nucleotide sequences containing a concatenation of nucleotides which are hybridizable in stringent conditions (50 % formamide, 5XSC) with one or more sequences of the *nov* gene of chickens, wherein the cDNA of said gene comprises the nucleotide concatenation shown in the accompanying figure. These sequences may be used as probes for detecting complementary sequences to evaluate the development and/or differentiation of tumors.

## (57) Abrégé

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSC) avec une ou plusieurs séquences du gène *nov* de poule dont l'ADNc comporte l'enchaînement de nucléotides représenté sur la figure. Ces séquences sont utilisables comme sondes de détection de séquences complémentaires pour l'évaluation du développement et/ou de la différenciation de tumeurs.



### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MI	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

## SEQUENCES DE NUCLEOTIDES, CAPABLE DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides et les séquences d'acides aminés correspondantes. Elle concerne également l'obtention de ces séquences et leurs applications.

Il est admis depuis de nombreuses années que le néphroblastome induit par le virus auxiliaire de la myéloblastose aviaire (MAV) constitue un modèle animal de la tumeur de Wilms chez l'enfant. Bien que ces deux types de tumeurs aient des étiologies différentes, aucun virus n'ayant été associé jusqu'à présent au développement du néphroblastome humain, on conçoit que l'étude, au niveau moléculaire des néphroblastomes viro-induits, peut permettre de caractériser des paramètres difficilement accessibles dans le système humain.

Les études des inventeurs concernant de tels néphroblastomes aviaires induits par le MAV leur ont permis de caractériser chez la poule un gène embryonnaire appelé gène nov dont l'expression s'avère stimulée à des niveaux variables dans les tumeurs, mais qui est éteint dans les cellules de rein adulte normal.

En développant leurs travaux dans ce domaine, les inventeurs ont élaboré des outils leur permettant d'étudier l'expression de gènes homologues dans les tumeurs humaines et dans certains types cellulaires.

Ainsi, en clonant les séquences désoxyribonucléiques et un ADN complémentaire correspondant au gène nov des cellules normales de poule, les inventeurs ont établi la séquence nucléotidique partielle des ADN et la séquence nucléotidique complète de l'ADNc. Des sondes moléculaires spécifiques ont été établies sur la base de cette séquence

et utilisées pour détecter la présence et l'expression de gènes homologues dans divers types cellulaires humains.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides d'un gène impliqué notamment dans les cellules tumorales.

Elle a également pour but de fournir des moyens pour l'isolement de ces séquences.

L'invention vise en outre les protéines codées correspondantes et les anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre ces protéines.

L'invention vise de plus l'utilisation de ces séquences, protéines et anticorps dans des applications biologiques, en particulier dans des tests de détection.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide 5 XSCC), avec une ou plusieurs séquences du gène *nox* de poule dont l'ADNc présente l'enchaînement de nucléotides (I), plus spécialement avec l'enchaînement (II).

Les enchaînements des séquences de nucléotides et de protéines auxquels il est fait référence dans la description et les revendications sont donnés en fin de description.

La séquence nucléotidique entière du clone d'ADNc *nox* de poule est formée de 1975 pb et comprend au moins 5 exons. Cette séquence comprend un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb, codant pour une protéine potentielle de 32300 Da, allant du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux signaux de motifs potentiels

de polyadénylation AATAAA en position 1914 et 1932. Ce gène nox de poule est surexprimé dans des néphroblastomes aviaires induits par MAV étudiés par les inventeurs.

Les expériences d'hybridation réalisées dans des conditions stringentes définies ci-dessus montrent que, de manière inattendue, des séquences homologues du gène nox de poule existent dans le génome humain.

Les séquences homologues isolées, chez l'homme ou l'animal, sont utilisables pour le criblage de banques réalisées à partir d'ARN-m, et permettent d'isoler des ADNc et ainsi d'identifier les autres exons des gènes de la même famille. Ces exons et les gènes qui les renferment, ainsi que les protéines codées correspondantes font également partie de l'invention.

On a indiqué ci-dessus que les expériences d'hybridation étaient réalisées dans des conditions stringentes, ce qui permet d'isoler des séquences présentant de fortes homologies avec celles des sondes.

Ces expériences peuvent être également réalisées dans des conditions non stringentes, en réduisant la quantité de formamide, de sel et/ou le temps de lavage, comme décrit dans "A practical guide to molecular cloning", second edition, B. Perbal, John Wiley and Sons, New York, 1988. Les séquences isolées présenteront alors une homologie moins forte que précédemment avec les séquences des sondes et conduiront à l'identification d'exons présentant moins de séquences communes.

Des séquences de nucléotides de l'invention sont plus particulièrement caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du

deuxième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

Les lettres indiquées dans ces enchaînements présentent les significations conventionnelles figurant dans l'ouvrage de Perbal cité plus haut.

L'invention vise en particulier les séquences nucléotidiques comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 70 % avec le fragment de protéine, correspondant au deuxième exon du gène nov de poule, répondant à la séquence (IV).

Les séquences de nucléotides capables de s'hybrider avec l'enchaînement (III) ci-dessus sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique, dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant, ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question, sont représentées sur la figure 2A.

De telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (V).

On notera la présence, dans ces séquences d'acides aminés rencontrées chez l'homme, d'une séquence consensus de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF). Cette séquence apparaît donc conservée chez l'homme.

Les différentes séquences évoquées ci-dessus comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (VI) suivant, correspondant au fragment Pst I mentionné plus haut, plus spécialement de l'enchaînement (VII).

L'enchaînement (VII) comporte 225 nucléotides avec 70 % d'homologie environ avec l'exon 2 du gène *nox* de poule.

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène *nox* de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

Des séquences du type défini ci-dessus comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 73 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène *nox* de poule répondant à la séquence (IX).

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 800 pb et d'un fragment PstI de 2 kb, tels qu'obtenus à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question est représentée sur la figure 2A.

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) d'acides aminés. On observera que cette séquence d'acides aminés peut être mise en évidence chez l'homme.

Ces séquences d'acides aminés comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement de l'enchaînement (XII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène *nox* de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XIII).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 85 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène *nox* de poule répondant à la séquence (XIV).

De telles séquences, capables de s'hybrider avec au moins une partie de l'enchaînement (XIII) ci-dessus, sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment *HincII* d'environ 400 pb, tel qu'obtenu selon les méthodes évoquées ci-dessus pour les autres fragments de restriction (voir figure 2B).

Selon un autre aspect, ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XV).

Les séquences évoquées ci-dessus en rapport avec le quatrième exon du gène *nox* de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XVI), correspondant au fragment *HincII* mentionné plus haut, plus particulièrement de l'enchaînement XVII.

D'autres séquences de nucléotides encore, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider avec au moins une partie du premier exon du



gène nox de poule qui comprend la séquence nucléotidique XVIII.

Selon au autre aspect, de telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 30 % avec le fragment de protéine correspondant au premier exon du gène nox de poule répondant à la séquence (XIX).

De telles séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XX).

Les séquences définies ci-dessus en rapport avec le premier exon du gène nox de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXI).

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène nox de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

De telles séquences sont encore caractérisées en ce qu'elles codent pour un fragment de protéine répondant à l'enchaînement (XXIII) suivant d'acides aminés.

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb tel qu'obtenu selon le protocole évoqué plus haut (voir figure 2B).

Des séquences du type de celles du fragment PstI de 700 pb ci-dessus sont plus particulièrement

caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène nox de poule qui comprend la séquence (XXIV).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène nox de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXV).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXVI) d'acides aminés.

On observera que cette séquence peut être mise en évidence chez l'homme. Ces séquences comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXVII), plus particulièrement de l'enchaînement (XXVIII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nox de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XXIX).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 80 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène nox de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXX).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXXI).

Ces séquences sont formées par ou comprennent plus particulièrement l'enchaînement nucléotidique (XXXII).

Selon un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour les signaux de terminaison de la transcription.

L'invention vise également les séquences promotrices des gènes comportant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Elle vise en particulier au moins une partie de la séquence promotrice du gène nox <sup>un</sup> humain dont les exons <sup>un</sup> deux, trois et quatre sont donnés sur la figure 2A. Cette séquence promotrice qui correspond à l'enchaînement (XXXIII) est localisée dans un fragment PstI-Hind III de 2,2 kb et comprend les 283 nucléotides en amont au début du premier exon.

La séquence promotrice du gène nox humain est caractérisée en ce qu'elle comporte plusieurs séquences consensus de différents facteurs de transcription tels que NF1 (TGGCCTTCTGCCAATC), AP1 (TGAATAA) et Sp1 (GCCACTCCCC).

Elle comprend également une séquence de vingt répétitions de motifs TG qui peut constituer une séquence de polymorphisme, conférant un intérêt à cette séquence comme marqueur de polymorphisme.

L'invention vise également la séquence promotrice du gène CTGF identifiée dans le fragment EcoRI - PstI de 700 pb environ, qui correspond à l'enchaînement (XXXIV).

Cette séquence est caractérisée en ce qu'elle comporte des sites de fixation des facteurs de transcription tels que SRF (CCTAAAAGG), AP1 (TGAATCA), Sp1 (CCCGCCC), un site potentiel de fixation à la protéine Wt1 (CGCCCCGGC) et un site NF kappa B (GAGAGCCCC). Elle comporte également une TATA base (TATAAAA).

La séquence promotrice du gène *nox* de poule répondant à l'enchaînement (XXXV) fait également partie de l'invention.

Cette séquence est contenue dans un fragment SmaI-XhoI d'environ 1 kb qui comporte des séquences consensus de différents facteurs de transcription ainsi qu'une TATA base. Elle est caractérisée en particules en ce qu'elle comprend les sites suivants de fixation du facteur Sp1 : GGGGGCGGGG, CCCCCGCCTC, Ap2 : CCGCAGGC, GCGGGGGC, GGGTCCC.

Elle comprend également un site de fixation du facteur NF kappa E2 (GGCAGGTGG) et du facteur NFkB (GGGAGTTTC).

Il est entendu que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées. Les séquences correspondantes entrent dans le cadre de l'invention, dès lors qu'un fragment de ces séquences utilisé comme sonde donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour des protéines telles que définies ci-dessus exprimées dans les cellules tumorales.

L'invention vise également en tant qu nouveaux produits les ARN correspondant aux différentes séquences définies ci-dessus et les séquences complémentaires des différents enchainements nucléotidiques définis.

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants de clonage et d'expression capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Les souches de microorganismes transformées ou transfectées entrent également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

Elle vise également les séquences d'acides aminés correspondant, selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides définies plus haut, et les protéines exprimées par les gènes comportant ces séquences.

Les séquences d'acides aminés homologues à celles codées par l'exon 2, qui contiennent le site de liaison aux facteurs de croissance IGF présentent un intérêt particulier, étant donné que le gène IGFII, qui se trouve chez l'homme sur le chromosome 11p15, est surexprimé dans certaines tumeurs de Wilms et pourrait donc être impliqué dans cette pathologie.

Dès lors que le motif consensus des protéines se liant à l'IGF joue un rôle important dans le développement des néphroblastomes en conjonction avec la dérégulation de l'expression d'IGFII, on mesure l'intérêt de la détection d'une expression anormale des protéines de l'invention qui renferment un tel motif.

Les protéines de l'invention sont également caractérisées en ce qu'elles sont telles qu'obtenues par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées ou transfectées et récupération de la protéine à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

La production de ces protéines par un tel procédé fait également partie de l'invention.

Les protéines de l'invention et leurs fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement un épitope des protéines ci-dessus, ou d'un fragment de ces protéines, sont également visés par l'invention.

L'invention vise en outre les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques purifiés, ou d'ARN correspondants, de sondes moléculaires pour rechercher la présence éventuelle de séquences de nucléotides apparentées au gène nox dans divers types cellulaires.

L'élaboration de ces sondes comprend, notamment, la dénaturation des séquences double-brin pour obtenir une séquence monobrîn.

Les essais effectués pour détecter la présence de séquences complémentaires dans diverses tumeurs et tissus humains ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments intragéniques.

L'utilisation de ces sondes a ainsi permis de montrer que le gène renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus est exprimé dans plusieurs types de cellules humaines, y compris certaines tumeurs du rein.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le gène humain apparenté au gène *nox* de poule comme défini plus haut entre dans le cadre de l'invention.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus courts d'environ 25 à 40 nucléotides.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant les nucléotides à étudier.

Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec l'échantillon biologique à tester ou

leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit étudié.

On peut, par exemple, avoir recours à la méthode d'hybridation sur taches ou à la méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Dans la première méthode, selon la technique classique, on dépose une quantité aliquote d'ADN dénaturé sur des membranes de nitrocellulose. La deuxième méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles.

Ces sondes constituent des marqueurs tumoraux en permettant la détection précoce de l'expression du gène renfermant lesdites séquences nucléotidiques, qui normalement n'est pas ou peu exprimé dans les tissus normaux correspondants. L'invention fournit ainsi des moyens permettant d'évaluer le développement et/ou la différenciation tumorale.

La détection pour l'identification spécifique des ADN peut être également réalisée par des techniques d'amplification de l'ADN (PCR) telles que décrites dans les brevets US 4683202 et 4683195 au nom de Cetus Corporation.

Dans ces techniques, on utilise deux amorces d'environ une quinzaine de nucléotides comprises dans l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus et distantes d'environ 200 à 250 nucléotides. L'une des séquences est capable de se lier à une séquence de nucléotides de l'un des brins du fragment d'ADN à amplifier et située au niveau de l'une des extrémités de ce fragment, par exemple à l'extrémité 5'. L'autre séquence est capable



de se lier à une séquence de nucléotides du deuxième brin du fragment d'ADN à amplifier, et se trouve située au niveau de l'extrémité de ce fragment opposée à celle mentionnée plus haut (à l'extrémité 3', lorsque la première se trouve à l'extrémité 5').

L'invention vise également un procédé de détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences complémentaires de celles définies ci-dessus. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique à étudier avec une sonde nucléotidique telle que définie plus haut dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et la séquence de nucléotides recherchée,

- la détection du complexe d'hybridation.

Le cas échéant, on procède à une amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces, telles que décrites ci-dessus, susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides.

L'utilisation d'un tel procédé représente une augmentation de sensibilité et un gain de temps considérable par rapport aux techniques classiques qui nécessitent souvent une technologie ne pouvant être mise en oeuvre que dans des services spécialisés. Il permet de plus une détection rapide et de grande spécificité des ADN et des différentes espèces d'ARNm de transcription. Ce procédé constitue un moyen de détection d'un remaniement

chromosomique au niveau des gènes qui codent pour les ARN noy ou CTGF sans avoir recours à des cultures cellulaires.

Pour la mise en oeuvre d'une telle méthode de dépistage in vitro, basée sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,

- un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

- une quantité déterminée d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention,

- un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie des produits exprimés et l'anticorps et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés lors de la réaction immunologique.

La présence dans les protéines de l'invention d'une séquence de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF) est avantageusement mise à profit selon l'invention pour le dosage des protéines. A cet effet, on met en contact les protéines de l'échantillon biologique à étudier avec un IGF comportant un groupe marqué, par exemple un groupe radioactif ou sonde froide et on effectue le dosage de la quantité de produit fixé.

On rapporte ci-après à titre d'exemples non limitatifs le clonage et le séquençage du gène nox de poule, et de séquences de nucléotides répondant aux définitions données plus haut. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 et 2,

- la figure 1 représentant la séquence d'ADNc du gène nox de poule et celle de la protéine potentielle codée

- les figures 2 A et 2 B les cartes de restriction de fragments d'ADN de l'invention

Procédés de clonage moléculaire et séquençage rapportés dans les exemples :

purification des acides nucléiques : utilisation de dichlorométhane comme décrit dans V. Maloisel et al., Met. Mol. Cell. Biol. 1, 245-247, 1990.

Southern et Northern blots, et autres procédés de clonage : effectués selon les protocoles standards publiés par B. Perbal dans "A practical guide to molecular cloning, second edition, B. Perbal John Wiley and Sons, New York, 1988

purification des fragments d'ADN BamHI-HindIII de 7 kb et SacI de 6,6 kb : méthode Geneclean (Bio 101).

Sondes radioactives : préparées par nick translation en présence d' $\alpha$  dCTP 32P.

Séquençage des nucléotides : selon la méthode de terminaison de chaîne au didéoxy en présence d' $\alpha$  dATP 35S, de T7 polymérase ou de Séquenase (USB).

Exemple 1 :

### Isolement de l'ADNC du gène nox de poule

25 ng d'ADNC correspondant à de l'ARN poly A de fibroblastes d'embryons de poule de 13 jours sont ligaturés avec 1 µg de bras lambda gt10 pour préparer une banque d'ADNC de fibroblastes normaux de poule en utilisant le kit d'Amersham.

Après criblage avec une sonde cellulaire dérivée d'une tumeur, on purifie 7 clones, l'insert le plus long (1,9 kb) est purifié selon la méthode de Geneclean (BIO 101) et sous-cloné au site KpnI de Bluescript KS<sup>+</sup> (Stratagène) pour générer le clone pClK.

### Séquençage nucléotidique :

Le séquençage est réalisé par la méthode de terminaison de chaînes didéoxy-nucléotide en présence d' $\alpha$  <sup>35</sup>S dATP et de polymérase T7 (Pharmacia) ou de Séquenase dans les conditions décrites par les fabricants.

Des matrices sont obtenues à partir des clones recombinants M13mpl8 et M13mpl9. Les amorces de séquençage proviennent de Biolabs, New England. Les compressions GC sont résolues en utilisant la déoxy-inosine (USB).

### Caractérisation du gène cellulaire nox :

On effectue une analyse par Northern Blot d'ARN isolés de reins normaux, de fibroblastes d'embryons de poule (FEP) et de néphroblastomes en utilisant les sondes cellulaires dérivées d'une tumeur. La sonde HX1024 permet de détecter dans les FEP normaux une espèce d'ARNm de 2,2 kb dont l'expression est altérée dans tous les autres néphroblastomes. Le criblage d'une banque d'ADNC de FEP permet d'isoler un clone d'ADNC de 1,9 kb représentant l'ARNm de 2,2 kb exprimé dans les FEP normaux.

On a représenté sur la figure 1 la séquence entière nucléotidique de 1975 pb du clone d'ADNc de ce nouveau gène, surexprimé dans les néphroblastomes étudiés, appelé gène *nov*. Ce gène apparaît constitué de 5 exons. Un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb codant pour une protéine potentielle de 32300 Da a été identifié du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux motifs potentiels de signaux de polyadénylation (AATAAA) aux positions 1914 et 1932.

On a également indiqué sur cette figure les acides aminés potentiellement codés. Le polypeptide *nov* potentiel contient un noyau hydrophobe caractéristique d'un signal peptidique à son extrémité amino (avec 6 leucines). Cette protéine *nov* étant dépourvue d'autres régions hydrophobes présentes dans les protéines trans-membranaires, il est vraisemblable qu'elle est sécrétée. La protéine *nov* contient également le motif consensus GCGCCXXC des protéines liant les facteurs de croissance du type insuline (IGF) et un total de 39 résidus cystéine ne formant pas de cluster.

**Exemple 2 :** Isolement dans des cellules humaines de séquences de nucléotides apparentées au gène *nov* de poule.

On effectue un Southern blot de fragments d'ADN humain digéré par EcoRI avec le clone d'ADNc du gène *nov* de poule pClK. On opère dans les conditions stringentes rapportées par B. Perbal (voir référence ci-dessus).

On constate que quatre fragments EcoRI s'hybrident avec des séquences du gène *nov* de poule. Ces fragments comportent respectivement 15, 12, 8 et 5,6 kb.

**Exemple 3 :** Isolement de séquences de nucléotides apparentées au gène *nov* de poule.

A partir d'une banque d'ADN de placenta humain, on isole à l'aide de la sonde pClK radiomarquée deux groupes de clones lambda gt11 recombinants.

La carte de restriction partielle de lambda Hu92 (qui correspond à trois clones se chevauchant) et de lambda Hu93 (qui correspond à deux clones se chevauchant) et celles des sous-clones plasmidiques pBH7 et p56 sont représentées sur les figures 2A et 2B.

Les séquences de nucléotides humaines homologues à celles du gène *nox* de poule sont localisées dans un fragment d'ADN de 7,0 kb BamHI-HindIII du clone Hu92 et celles appartenant au gène CTGF dans un fragment d'ADN de 6,6 kb SacI du clone Hu93.

Sur ces cartes, les enzymes de restriction sont désignées comme suit : B = BglII, P = PstI, K = KpnI, H = HindIII, S = SacI, E = EcoRI, X = Xba, B = BamHI et Hc = HincII. Les blocs noirs représentent les régions exoniques humaines.

Le sous-clonage de ces fragments dans les vecteurs pUC18 et pUC19, appelés respectivement clones pBH7 et pS6 permet de localiser plus précisément les séquences homologues du gène *nox* de poule et les séquences du gène du CTGF. Les premières sont localisées d'une part dans un fragment d'ADN PstI de 600 pb (E2), d'autre part dans un fragment PstI de 800 pb (E3), et dans un fragment HincII de 400 pb (E4). La sonde pBH7 correspond au fragment HindIII-BamHI.

La localisation des premier, deuxième, troisième, quatrième et cinquième exons humains au CTGF sont indiquées sur la figure 2B (désignations respectives E1, E2, E3, E4, et E5).

L'utilisation des fragments PstI d'ADN purifiés comme sondes dans des expériences d'hybridation Southern avec les fragments EcoRI de l'exemple 2 conduit à la seule détection du fragment EcoRI d'ADN de 12 kb avec PB06 et du fragment EcoRI de 15 kb avec PSP07 démontrant que les séquences de PB06 et PSP07 correspondent à un sous-ensemble des exons nox de l'ADNc de poule.

**Exemple 4** : Détection d'ARN du génome humain apparentés au gène nox de poule.

On rapporte dans le tableau suivant les résultats d'expériences d'hybridation Northern avec différents tissus et lignées cellulaires en utilisant comme sondes les enchaînements de formule VIII, XV et XVI ci-dessus homologues respectivement des exons E2, du gène nox de poule et E3 et E4 du gène CTGF (ces codes étant utilisés dans le tableau pour les désigner).

TISSUS ET LIGNEES CELLULAIRES	SONDES		
	E2 ( <u>nov</u> )	E3-E4 (CTGF)	kb de 1'ARNm
Moelle osseuse	+	+	(2, )
thymus (foetal)	+	-	(2,5)
	-	+	(7,4)
Foie (foetal)	-	-	(2,5)
HEL	-	+	(2,5)
Cerveau (foetal)	+	-	(2,5)
	-	+	(7,4)
Neuroblastome 1	+	+	(2,5)
Neuroblastome 162	+	+	(2,5)
	-	+	(7,4)
Rein (foetal)	+	+	(2,5)
Nephroblastome Bou	nt	+	(2,5)
Tissu mammaire	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire gg	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire sc	nt	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	+	(7,4)
SK-BR3	-	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	+	(7,4)



poumon (foetal)	+	+	(2,5)
coeur (foetal)	+	+	(2,5)
lignée 293	+	+	(2,5)
	-		
MCF7	-	+	(7,4)
Carcinome embry test. 8	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 10	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 11	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Adenocarcinome U377	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
HL60	nt	+	(7,4)

nt = non testé

Les résultats obtenus montrent que le gène humain homologue du gène *nox* de poule et le gène CTGF appartenant à la même famille sont exprimés selon les tissus ou lignées sous la forme de différentes espèces d'ARN détectés soit par les deux sondes, soit par une seule d'entre elles.

L'espèce d'ARNm de 7,4 kb exprimée par certains tissus et lignées n'apparaît reconnue que par la sonde PSP07.

Ces résultats indiquent que la régulation des gènes chez l'homme dépendrait de la spécificité tissulaire.



## ENCHAINEMENT II

GAG	CCC	TCC	CGC	TGC	TCC	CTG	CTG	TGC	CCC	TGC	CGC	GAG	CCG	CCG	TGC	GCC	CCG	GGA	GTG	CCC	CCC	GTG	CTG	185		
<hr/>																										
TGC	GAC	CGC	GGC	CCC	CAG	GAC	GGC	GGC	GGC	GGC	ATC	TGC	ATG	GTG	CTG	GAA	GGG	GAC	TTC	GAT	GGG	ATG	TAC	CGC	275	
MAC	GGG	GAG	ACG	TTC	CAG	CCC	AGC	TGC	AMG	TAC	CAG	TGC	ACC	TGC	CGG	GAC	GGG	CAG	ATC	GGG	TGC	CTG	CCC	CGC	365	
CTG	CTC	CCC	GGC	CCC	GAC	TGC	CCC	TTC	CCG	CSG	ANG	ATC	GAA	GTC	CCC	GGAA	GGG	TGC	TGC	GGG	ATG	CTG	GGC	CTG	455	
GTG	CTC	CTG	CGA	GGC	TTT	GCT	ATG	GCT	GCA	TAC	AGA	CAG	GAG	GCC	ACA	CTT	GGG	ATA	GAC	GTG	TCT	GAT	TCA	ACT	545	
CAG	ACA	ACA	GAA	TGG	AGT	GCT	TGT	TCC	AAA	AGC	TGT	CGA	ATG	GGC	TTT	TCT	ACC	CGT	GTT	ACC	AAC	AGA	AAT	CAG	CAG	635
AAG	CAG	ACA	CGA	CTT	TGC	ATG	ATG	AGA	CCT	TGT	GAA	AAC	GAA	GAG	CCA	TCT	GAT	AAG	AAA	GGA	AAA	AAA	TGT	ATC	CAA	725
<hr/>																										
TGC GGC GGG CGC TGC CCC GCG GAG CCG CCG CGC TGC TGC GCC CCG GGA GTG CCC GGC GTG CTG																										
TGC GAC CGC GGC CCC CAG GAC GGC GGC GGC GGC GGC ATC TGC ATG GTG CTG GAA GGG GAC AAC TGC GTG TTC GAT GGG ATG ATT TAC CGC																										
MAC GGG GAG ACG TTC CAG CCC AGC TGC AMG TAC CAG TGC ACC TGC CGG GAC GGG CAG ATC GGG TGC CTG CCC CGC TGC AAC CTG GGC CTG																										
CTG CTC CCC GGC CCC GAC TGC CCC TTC CCG CSG ANG ATC GAA GTC CCC GGAA GGG TGC TGC GAG ANG TGG GTG TGC GAC CCC AGG GAT GAA																										
GTG CTC CTG CGA GGC TTT GCT ATG GCT GCA TAC AGA CAG GAG GCC ACA CTT GGG ATA GAC GTG TCT GAT TCA ACT GCC AAT TGT ATT GAA																										
CAG ACA ACA GAA TGG AGT GCT TGT TCC AAA AGC TGT CGA ATG GGC TTT TCT ACC CGT GTT ACC AAC AGA AAT CAG CAG IGT GAG ATG GTG																										
AAG CAG ACA CGA CTT TGC ATG ATG AGA CCT TGT GAA AAC GAA GAG CCA TCT GAT AAG AAA GGA AAA AAA TGT ATC CAA ACA AAG																										

ENCHAINEMENT III

101	111	121	131	141	151
AGGTGAGCGG	GCGGGAGGCG	GCGTGCCCCC	GGCCCTGCGG	CGGGCGCTGC	CCCCGGGAGC.
161	171	181	191	201	211
CGCCGCGCTG	CGCCCCGGGA	GTGCCCCGCG	TGCTGGACGG	CTGCGGCTGC	TGCCCTGGTGT
221	231	241	251	261	271
GGCCCCGGCA	GCGCGGCGAG	AGCTGCTCCC	CTCTGCTGCC	CTGCGACGAG	AGCGGCGGCC
281	291	301	311	321	
TCTACTGCGA	CCGCGGCCCC	GAGGACGGCG	GCGGCGCCCG	CATCTGCATG	

ENCHAINEMENT IV

33	43	53	63	73	83
VSGREACPR	PCGGRCPAEP	PRCAPGPAV	LDGCGCCLVC	ARQGESCS	LLPCDESGGL
93					
YCDRGPEDGG	GAGICM				

## ENCHAINEMENT V

V	A	A	T	Q	R	C	P	P	Q	C	P	G	R	C
756					771				786					
P	A	T	P	P	T	C	A	P	G	V	R	A	V	L
801					816				831					
D	G	C	S	C	C	L	V	C	A	R	Q	R	G	E
846					861				876					
S	C	S	D	L	E	P	C	D	E	S	S	G	L	Y
891					906				921					
C	D	R	S	A	D	P	S	N	Q	T	G	I	C	T

## ENCHAINEMENT VI

355 365 375 385 395 405  
CTGCAGCCAA CCGGCTTGTG CCGGTCCCAG GAGCGCGCTA TAAACCTGT GCTGGGCGTG

415 425 435 445 455 465  
ATCGGCAAGC ACCGGACCAG GGGGAAGCG AGCAGTGCCA ATCTACAGC AAGAAAGTCT

475 485 495 505 515 525  
CGTTTGTA AAGCGAGAGG GGAAAGCCTG AGCATGCAGA GTGTGCAGAG CACGAGCTTT

535 545 555 565 575 585  
TGCTCGCGA AAGCAGTGCC TTGCGCTGAC CTTCCTGCTT CTCCATCTCC TGGGACAGTA

595 605 615 625 635 645  
AGTGGCACAC CCTTAAGATG CCCCCAAAGT TACTTTGCC GCCTTGGTG CCCCCATTG

655 665 675 685 695 705  
GTCACCGGC TCACTGCGTC TTCTGTCCCA GCTGAGTGT TTCTCCTTGT CTCGCCCTGCC

715 725 735 745 755 765  
TTCAGGTCG TCGGACTCAG CGCTGCCCTC CCCAGTGCCC GGGCCGGTGC CCTGCGACGC

775 785 795 805 815 825  
CGCCGACCTG CGCCCCCGGG GTGCGCGCGG TGCTGGACGG CTGCTCATGC TGTCTGGTGT

835 845 855 865 875 885  
GTGCCCCGCA GCGTGGCGAG AGCTGCTCAG ATCTGGAGCC ATGCGACGAG AGCAGTGGCC

895 905 915 925 935 945  
TCTACTGTGA TCGCAGCGCG GACCCACGA ACCAGACTGG CATCTGCACG GGTAATCCTG

955 965 975  
CTCCCTCTGC TGTTGACCT CTTCCTCTGC AG

## ENCHAINEMENT VII

720 730 740 750 760 770  
 GTCGCTGCCA CTCAGCGCTG CCTCTCCCAG TGCCCGGGCC GGTGCCCTGC GACGCCGCCG  
  
 780 790 800 810 820 830  
 ACCTGCGCCC CCGGGTGCG CGCGGTGCTG GACGGCTGCT CATGCTGTCT GGTGTGTGCC  
  
 840 850 860 870 880 890  
 CGCCAGCGTG GCGAGAGCTG CTCAGATCTG GAGCCATGCG ACGAGAGCAG TGGCCTCTAC  
  
 900 910 920 930  
 TGTGATCGCA GCGCGGACCC CAGCAACCAG ACTGGCATCT GCACGG

## ENCHAINEMENT VIII

331 341 351 361 371 381  
 GTGCTGGAAG GGGACAACTG CGTGTTTCGAT GGGATGATTT ACCGCAACGG GGAGACGTTT  
  
 391 401 411 421 431 441  
 CAGCCCAGCT GCAAGTACCA GTGCACCTGC CCGGACGGGC AGATCGGGTG CCTGCCCCCG  
  
 451 461 471 481 491 501  
 TGCAACCTGG GCCTGCTGCT CCCCCGCCCC GACTGCCCTT TCCCCGGGAA GATCGAAGTC  
  
 511 521 531 541 551 561  
 CCGGAGAGT GTCGCGAGAA GTGGGTGTGC GACCCCAGGG ATGAAGTGCT CCTGGGAGGC  
  
 571  
 TTTGCTATGG CT



## ENCHAINEMENT IX

109 119 129 139 149 159  
 VLEGDNCFD GMIYRNETF QPSCKYQCTC RDGQIGCLPR CNLGLLLPGP DCPFPRKIEV  
 169 179  
 PGECCCKWVC DPRDEVLLGG FAMA

## ENCHAINEMENT X

116 131 146  
 GCG GTA GAG GGA GAT AAC TGT GTG TTC GAT GGG GTC ATC TAC CGC  
 A V E G D N C V F D G V I Y R  
 161 176 191  
 AGT GGA GAG AAA TTT CAG CCA AGC TGC AAA TTC CAG TGC ACC TGC  
 S G E K F Q P S C K F Q C T C  
 206 221 236  
 AGA GAT GGG CAG ATT GGC TGT GTG CCC CGC TGT CAG CTG GAT GTG  
 R D G Q I G C V P R C Q L D V  
 251 266 281  
 CTA CTG CCT GAG CCT AAC TGC CCA GCT CCA AGA AAA GTT GAG GTG  
 L L P E P N C P A P R K V E V  
 296 311 326  
 CCT GGA GAG TGC TGT GAA AAG TGG ATC TGT GGC CCA GAT GAG GAG  
 P G E C C E K W I C G P D E E  
 341  
 GAT TCA CTG GGA GGC CTT ACC CTT GCA G  
 D S L G G L T L A

## ENCHAINEMENT XI

```

10 AAAAGGACTT GGGTTTGGG ACATGCCCTC CAAATCTTAC ATAGCTTCTT CACTGTATTG 60
70 TGTTCCTTGT TTTCCCTCTC CTCCTTGGCTT TTCACCTTGC TTCCCCAATA TTCTAGCGGT 120
130 AGAGGGAGAT AACTGTGTGT TCGATGGGGT CATCTACCGC AGTGGAGAGA AATTTCAGCC 180
190 AAGCTGCAAA TTCCAGTGCA CCTGCAGAGA TGGGCAGATT GGCTGTGTGC CCCGCTGTCA 240
250 GCTGGATGTG CTA CTGCTG AGCCTAACTG CCCAGCTCCA AGAAAAGTTG AGGTGCCCTGG 300
310 AGAGTGCTGT GAAAAGTGGA TCTGTGGCCC AGATGAGGAG GATTCACCTG GAGGCCCTTAC 360
370 CCTTGCAGGT GAGAAACTCA ATATACCTAG GGCTGGTCAT AGTAGAGGGT AAATACAAAC 420
430 ATGAAGAATT TGCAATCTCT TGGATTGAA AA 450

```

## ENCHAINEMENT XII

125 135 145 155 165 175  
 GCGGTAGAGG GAGATAACTG TGTGTTTCGAT GGGGTCATCT ACCGCAGTGG AGAGAAATTT  
 185 195 205 215 225 235  
 CAGCCCAAGCT GCAAATTCCA GTGCACCTGC AGAGATGGGC AGATTGGCTG TGTGCCCCCGC  
 245 255 265 275 285 295  
 TGTACAGCTGG ATGTGCTACT GCCTGAGCCT AACTGCCCCAG CTCCAAGAAA AGTTGAGGTG  
 305 315 325 335 345 355  
 CCTGGAGAGT GCTGTGAAAA GTGGATCTGT GGCCCCAGATG AGGAGGATTC ACTGGGAGGC

365  
 CTTACCCCTG CAG

33

## ENCHAINEMENT XIII

583 593 603 613 623 633  
 GCATACAGAC AGGAGGCCAC ACTTGGGATA GACGTGTCTG ATTCAAGTGC CAATTGTATT  
 643 653 663 673 683 693  
 GAACAGACAA CAGAATGGAG TGCTTGTTC AAAAGCTGTG GAATGGGCTT TTCTACCCGT  
 703 713 723 733 743 753  
 GTTACCAACA GAAATCAGCA GTGTGAGATG GTGAAGCAGA CACGACTTG CATGATGAGA  
 763 773  
 CCTTGTGAAA ACGAAGAGCC ATCTGATAA

## ENCHAINEMENT XIV

193 203 213 223 233 243  
 AYRQEATLGI DVSDSSANCI EQTTEWSACS KSCGMGFSTR VTNRNQOCCEM VKQTRLCCMMR

253  
 PCENEEPSDK

## ENCHAINEMENT XV

104 119 134  
 GCT TAC AGG CCA GAA GCC ACC CTA GGA GTA GAA GTC TCT GAC TCA  
 A Y R P E A T L G V E V S D S  
 149 164 179  
 AGT GTC AAC TGC ATT GAA CAG ACC ACA GAG TGG ACA GCA TGC TCC  
 S V N C I E Q T T E W T A C S  
 194 209 224  
 AAG AGC TGT GGT ATG GGG TTC TCC ACC CGG GTC ACC AAT AGG AAC  
 K S C G M G F S T R V T N R N  
 239 254 269  
 CGT CAA TGT GAG ATG CTG AAA CAG ACT CGG CTC TGC ATG GTG CGG  
 R Q C E M L K Q T R L C M V R  
 284 299  
 CCC TGT GAA CAA GAG CCA GAG CAG CCA ACA GAT AAG  
 P C E Q E P E Q P T D K

## ENCHAINEMENT XVI

10	20	30	40	50	60
ATCAGAGTCG	AATGAGACCC	AGTTTCTAAT	AATGGCTGAA	AAGGACCACT	TTCCAATCCT
70	80	90	100	110	120
CACATTGATC	CTAATATGGC	TGTCTTTATT	TATACATCCC	ATAGCTTACA	GGCCAGAAGC
130	140	150	160	170	180
CACCCTAGGA	GTAAGAAGTCT	CTGACTCAAG	TGTCAACTGC	ATTGAACAGA	CCACAGAGTG
190	200	210	220	230	240
GACAGCATGC	TCCAAGAGCT	GTGGTATGGG	GTTCTCCACC	CGGGTCACCA	ATAGGAACCG
250	260	270	280	290	300
TCAATGTGAG	ATGCTGAAAC	AGACTCGGCT	CTGCATGGTG	CGGCCCTGTG	AACAAGAGCC
310	320	330	340	350	360
AGAGCAGCCA	ACAGATAAGG	TAGGAGCCCTG	GAGGAAACCT	CCCATCCTGA	AGGTAATGGC
370	380	390	400	410	420
CTTGTGTCCT	TGGAGCCCTGG	GCTTCAGAAA	GTCACCTGTTG	CACTCTGTGA	CGGAGAGAGC
430					
AGCTATAGCG	GGGAG				

## ENCHAINEMENT XVII

113	123	133	143	153	163
GCTTACAGGC	CAGAAGCCAC	CCTAGGAGTA	GAAGTCTCTG	ACTCAAGTGT	CAACTGCATT
173	183	193	203	213	223
GAACAGACCA	CAGAGTGGAC	AGCATGCTCC	AAGAGCTGTG	GTATGGGGTT	CTCCACCCCG
233	243	253	263	273	283
GTCACCAATA	GGAACCGTCA	ATGTGAGATG	CTGAACACAGA	CTCGGCTCTG	CATGGTGCGG
293	303	313			
CCCTGTGAAC	AAGAGCCAGA	GCAGCCAACA	GATAAG		

## ENCHAINEMENT XVIII

33	43	53	63	73	83
TATGGAGACG	GGCGCGGGC	AGGGGCTGCC	CGTCCTGCTG	CTGCTCCTGC	TCCTCCTCCG
GCCGTGCGA					

## ENCHAINEMENT XIX

10 20  
 METGGGQGLP VLLLLLLLR PCE

## ENCHAINEMENT XX

285 300 315  
 ATG GCA ACC CCG GGG TTC GTT CCA CTT CCC CAC CCA GCC GAT CTC  
 M A T P G F V P L P H P A D L  
 330 345  
 CCC CCT CCT CCC TGC ACT GCA GCC AAC CGG CTT  
 P P P P C T A A N R L

## ENCHAINEMENT XXI

294 304 314 324 334 344  
 ATGGCAACCC CGGGGTTTCGT TCCACTTCCC CACCCAGCCG ATCTCCCCC TCCTCCCTGC  
 354  
 ACTGCAGCCA ACCGGCTT

## ENCHAINEMENT XXII

AAC GGG GAG ACG TTC CAG CCC AGC TGC AAG TAC CAG TGC ACC TGC CGG GAC GGG CAG ATC GGG GAC AAC TGC GTG TTC GAT GGG ATG ATT TAC CCC	365
CTG CTC CCC GGC CCC GAC TGC CCC TTC CCG CGG AAG ATC GAA GTC CCC GGA GAG TGC TGC GAG AAG TGG GTG TGC GAC CCC AGG GAT GAA	455
GTG CTC CTG GGA GGC TTT GCT ATG GCT GCA TAC AGA CAG GAG GCC ACA CTT GGG ATA GAC GTG TCT GAT TCA AGT GCC AAT TGT ATT GAA	545
CAG ACA ACA GAA TGG AGT GCT TGT TCC AAA AGC TGT GGA ATG GGC TTT TCT ACC CGT GTT ACC AAC AGA AAT CAG CAG TGT GAG ATG GTG	635
AAG CAG ACA CGA CTT TGC ATG ATG AGA CCT TGT GAA AAC GAA GAG CCA TCT GAT AAG	725

8



## ENCHAINEMENT XXIII

Q	I	P	T	R	I	P	D	A	L	D	V	R	V	P
48				63					78					
Q	C	L	T	S	A	S	P	T	P	L	F	P	S	S
93				108					123					
S	P	A	K	D	G	A	P	C	I	F	G	G	T	V
138				153					168					
Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	C	K	Y	Q	C
183				198					213					
T	C	L	D	G	A	V	G	C	M	P	L	C	S	M
228				243					258					
D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	P	R	R	V
273				288					303					
K	L	P	G	K	C	C	E	E	W	V	C	D	E	P
318				333					346					
K	D	Q	T	V	L	G	P	A	S	R	V	S	R	V
363				378					393					
F	L	*	V	R	V	V	I	L	S	Q	G	G	S	P
408				423					438					
N	C	A	D	R	T	G	E	I	P	Y	P	G	V	D
453				468					483					
H	G	V	C	V	L	C	S	R	S	L	P	T	G	R
498				513					528					
H	V	W	P	R	P	N	Y	D	*	S	Q	L	P	G
543				558					573					
P	D	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M	G
588				603										
Y	S	T	R	V	T	N	D	N	A					

ENCHAINEMENT XXIV

CTGCGTGTTCGATGGGATGATTTACCGCAACGGGGAGACGTTCCAGCCCCAGCTGCAAGTACCAGTGCACC  
350 360 370 380 390 400  
190 200 210 220 230 240 250  
TGCCGGGACGGGCAGATCGGGTGCCCTGCCCGCGTGCACCTGGGCTGCTGCCCGGCCCGACTGCC  
420 430 440 450 460 470  
CCTTCCCCGGGAAGATCGAAG-TCCCCGGAGAGTGCTGCGAGAAGTGGGTGTGCGAC  
490 500 510 520 530

ENCHAINEMENT XXV

EGDNCVFDGMIYRNGETFQPSCKYQCTCRDQIGCLPRCNLGLLLPGPDCPPFRKIEVPGECEKW  
110 120 130 140 150 160  
VCD-PR  
170

ENCHAINEMENT XXVI

40 50 60 70 80 90 100  
DGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPPRRVKLPGKCCCEEWVCDE  
PR

ENCHAINEMENT XXVII

1  
CC

5	3	18	33
	CAG ATC CCA ACT CGC ATC CCT GAC GCT CTG GAT GTG AGA GTG CCC		
	48	63	78
	CAA TGC CTG ACC TCT GCA TCC CCC ACC CCT CTC TTC CCT TCC TCT		
10	93	108	123
	TCT CCA GCC AAA GAT GGT GCT CCC TGC ATC TTC GGT GGT ACG GTG		
	138	153	168
	TAC CGC AGC GGA GAG TCC TTC CAG AGC AGC TGC AAG TAC CAC TGC		
	183	198	213
	ACG TGC CTG GAC GGG GCG GTG GGC TGC ATG CCC CTG TGC AGC ATG		
15	228	243	258
	GAC GTT CGT CTG CCC AGC CCT GAC TGC CCC TTC CCG AGG AGG GTC		
	273	288	303
	AAG CTG CCC GGG AAA TGC TGC GAG GAG TGG GTG TGT GAC GAG CCC		
	318	333	348
	AAG GAC CAA ACC GTC CTT GGG CCT GCC TCG CGG GTG AGT CGA GTC		
	363	378	393
20	TTC CTC TAA GTC AGG GTC GTG ATT CTC TCC CAG GGA GGG AGT CCT		
	408	423	438
	AAC TGT GCC GAC CGA ACG GGG GAA ATA CCT TAT CCA GGC GTT TTA		
	453	468	483
	CAT GGT GTT TGT GTG CTC TGC TCT CGC AGC TTA CCG ACT GGA AGA		
25	498	513	528
	CAC GTT TGG CCC AGA CCC AAC TAT GAT TAG AGC CAA CTG CCT GGT		
	543	558	573
	CCA GAC ACA GAG TGG AGC GCC TGT TCC AAG ACC TGT GGG ATG GGC		
	588	603	
	ATC TCC ACC CGG GTT ACC AAT GAC AAC GCC TC		

ENCHAINEMENT XXVIII

35 190 200 210 220 230 240 250  
TGCCTGGTCCAGACA-CAGAGTGGAGCGCCTGTTCCAAGACCTGTGGGATGGGCATCTCCACCCGGGTTA  
260  
CCAA

ENCHAINEMENT XXIX

GCTTTGCTATGGCTGCATACAGACAGGAGGCCACACTTGGGATAGACGTGTCT--GATTCAAGTGCCCAAT  
570 580 590 600 610 620  
TGTATTGAACAGACACAGAATGGAGTGTCTGTTCCAAAAGCTGTGGAATGGGCTTTTCTACCCCGTGTTA  
630 640 650 660 670 680 690  
CCAA

ENCHAINEMENT XXX

TEWSACSKSCGMGFSTRVTNRN  
210 220

ENCHAINEMENT XXXI

70 80  
TEWSACSKTCGMGISTRVTNDN

ENCHAINEMENT XXXII

130 140 150 160 170 180  
CTGCTCTCGCAGCTTACCGACTGGAAGACACAGCTTGGCCCGACACCAACTATGATT-A-GAGCCAAC  
0 200 210 220 230 240 250  
CTGGTCCAGACA-CAGAGTGGAGCGCCTGTTCCAAGACCTGTGGGATGGGCATCTCCACCCGGGTTA

## ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 1

10	20	30	40	50	60
GCTTTCCTTT	TAAGGAACAG	TCCTTTCTTC	CCAAGAGAAC	TGCTCTTTCT	CTCCATTCCA
70	80	90	100	110	120
ACCATGAGGT	TCTAACTAAT	CCCCATACTT	CACCTTCCTT	GTCCCCATTG	ATTAGTCCAG
130	140	150	160	170	180
GGTGAACCCA	TCCAATTAA	TTCCCTGGAAC	TTTTAAAGTT	GGGCCTAAGA	GACAGGGACA
190	200	210	220	230	240
TTCCCTTCTGT	GGTGATAAGG	TCATAAAGTA	AGAAGATTGG	AAGGATCATT	TTTCCCTTAT
250	260	270	280	290	300
GTGGAAGTAA	TCCTGTGGC	CCTCCTCTCT	CTAGATCCCA	ATTGCCCTCTG	AGGACTCCCT
310	320	330	340	350	360
GTACCATTC	TGTGCTGTCA	CTATGTGAAA	CATCACAGCA	TCCTTCCAGT	AAAGTCCTCT
370	380	390	400	410	420
TTTCGCAAAA	ACTAGTTCAA	GTTTGGTTTC	CATCTCTTGC	AATCAAAACT	GAATAGCAAT
430	440	450	460	470	480
TTTACACTTG	CAGTGACTTC	TTGACATGTT	AATCCTTGTC	TTAAAGTTAC	ATTTTCCCTG
490	500	510	520	530	540
TCACCACCTC	CACCCCACTC	TTTCCAAGAA	GAGCTAGCCC	AATCTCCATG	TTGCCAAATT
550	560	570	580	590	600
CTCCTTGTTT	TATCTGAGTC	TATTATGCT	TGGAACACTT	GGCCGATGCT	CTTTGCCCTCC

## ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 1 (suite)

610	620	630	640	650	660
CCATTAGCAG	TGCTTCTAGT	TGCTCCATT	CAAAGTACAT	TAAATGCTG	TCTACCAAGA
670	680	690	700	710	720
GCCACCA	GAGAA	CTGAGTGGG	CAAGACTGGG	GCTCAGGAAT	CTGTATTTT
730	740	750	760	770	780
AACAAAATAC	ATGCTGGT	ATTCGATCTG	CAGCCAGATG	GAGGCATCAT	TAGGCCAAAT
790	800	810	820	830	840
GGCTTACAAA	ACCTATCAGT	TTTTTTGTTT	TTTGTTTTAT	CTTTTCTTA	AACTTTATT
850	860	870	880	890	900
TCAAGTTCAG	GGGAAATGTG	CAGGTTTGT	TACACAGGAA	ATGTGTCATG	GACATTTGTT
910	920	930	940		
GTGCAGATTA	TTTCATCGCC	CAGGTATTAA	GCCTGGTACC	GAGGTACC	

## ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2

10	20	30	40	50	60
CATTAGTTAT	TTTTCCCGAT	CTTCTCCCTG	CTCCCACCCT	CCACCCCTCCA	AAGCCTATCA
70	80	90	100	110	120
ATTGAAGAG	TAGGTAAATG	TCCTACTCAA	GAGTGCAAAT	GAACTGTTTC	ATCTCTAGTT
130	140	150	160	170	180
AAGTTTGAGT	ACTACTCAGT	CTCATTTACC	TCAAAGAAAG	CAGAACTATT	AGAGGCTTGG
190	200	210	220	230	240
AAGTGTGCA	TAGTGGTTTC	AGGCTGCCGA	GAGAAATTATC	TAGAAGGGGC	TTGAGGTGAC
250	260	270	280	290	300
CTCATCATCT	GCGGGTGTTG	CAGAGGCAGA	CCTGGCCCCCT	TCCGCAAGCT	GCCTTTGATT
310	320	330	340	350	360
TCCTTTCATGC	TGGGGACAGA	TGAGGTAGAG	GCCATTGTT	TCCTTTTAAA	CTCTAGAATT
370	380	390	400	410	420
ACATCACAGG	CCTGTATAAT	TTTCCCTTAAA	AAGTGTTTTT	TGTTTTTTTC	CAAAGCAACT
430	440	450	460	470	480
ATCCTCAAAA	GAGCTGGGCA	TAGTTCTCCT	AGGGGCAGCA	CCAGTGTTGA	AGTGTGGGGG
490	500	510	520	530	540
GAAACTGTTT	TAAATCCTTC	AAACAATGTC	ACCTTTGGAG	CAGTAAAACT	GCTCCCCTTTT
550	560	570	580	590	600
TCCCCATGAGA	GATGACAAGC	ATGCCCCCAGC	AATCATTTCT	TGAAAGCGGA	TGCCCCGGTGA
610	620	630	640	650	660
GAGAAGGATT	TGATTGCTG	AAGGGTCAGC	CAAGTTAAGC	CAGTTTCTTC	CTCATTTCTT

## ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2 (suite)

670	680	690	700	710	720
CCCTGGCTGG	AGGTTTGTAT	GGTGGTGATG	GTGGTTGAAC	TGAACCCACT	TAGAAAACTG
730	740	750	760	770	780
TCAAAGGTTT	CTGGACTCTC	AGGTGTGCCG	TCTCACATTT	GGTCTGCTAC	AGCAGGTGCT
790	800	810	820	830	840
TCAAGGCTTT	CTTCTGCCAA	GATTTCTTTG	TTTTATTTTA	TGATGTTTTT	TTTATGTGTG
850	860	870	880	890	900
TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTTTTAC	TTTTATTTCT	AACAAACCTG
910	920	930	940	950	960
TGACCTTGGG	GTTTAAGACT	GAGTGAAGCT	AGAAGGATTA	GAGTCAAAAG	AATTTTGCCA
970	980	990	1000	1010	1020
TTTGGCCAAT	AGCATTCCCC	CACCTCCTGA	CATATCGATT	TTTTTTCTAG	ATTCCTTCC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CCCTGCCACT	CCCCTCCCCC	CAACACACAC	ACACTTTTCT	CTTCTCTCCT	TTTCTCTCCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTTCTCCCTT	GCTTCTCTCC	CCTCCCTCTC	AACACATTCA	ATGAGTGCCC	TAAACGGTGA
1150	1160	1170	1180	1190	
CNAACCTGCA	TGTGCTTCCC	TCATGACTAA	ACCCCTGGCC	TTCTGCCAAT	CCCCTGACAG



## ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 3

10	20	30	40	50	60
CTGCAGGCAT	CCCGTAAGGA	CCCCACGCTT	GCAGCCCCTGG	TTGGAACGGT	CAGGGTGGAG
70	80	90	100	110	120
GAGGATGGTG	GGGAGTGGTG	GTGTCTTCGT	CCTGGGAGAA	GGCGAAGCAA	CTTCCAGGAG
130	140	150	160	170	180
GAAACGGGCG	TTTCCTTCCC	ACGCGCTCGA	GCGAGCCCTG	GGTCCTGGCC	TCGGAACCTCC
190	200	210	220	230	240
ACCCAGCCCC	TCCCCACCCT	CTGGGAAAAG	CCAGTCGCCC	CACACAGGCA	CAGGCAGGCC
250	260	270	280		
CCGGGCGCCG	GCCCTAAGGA	GAGCAGCACC	CACAGCCAAT	TGCC	

## ENCHAINEMENT XXXIV

10	20	30	40	50	60
CGAATTTT	AGGAATTCCT	GCTGTTTGCC	TCTTCAGCTA	CCTACTTCCT	AAAAAGGATG
70	80	90	100	110	120
TATGTCAGTG	GACAGAACAG	GGCAAACTTA	TTCGAAAAAG	AAATAAGAAA	TAATTGCCAG
130	140	150	160	170	180
TGTGTTTATA	AATGATATGA	ATCAGGAGTG	GTGCGAAGAG	GATAGGGAAA	AAAAAATTCT
190	200	210	220	230	240
ATTTGGTGCT	GGAAATACTG	CGCTTTTTTT	TTTCCTTTTT	TTTTTTTTCT	GCGAGCTGGA
250	260	270	280	290	300
GTGTGCCAGC	TTTTTCAGAC	GGAGGAATGC	TGAGTGTCAA	GGGTCAGGA	TCAATCCGGT
310	320	330	340	350	360
GTGAGTTGAT	GAGGCAGGAA	GGTGGGGAGG	AATGCCAGGA	ATGTCCCCTGT	TTGTGTAGAC
370	380	390	400	410	420
TCCATTTCAGC	TCATTGGCGA	GCGCCGCCGC	CCGGAGCGTA	TAAAAGCCTC	GGCCGCCCGC
430	440	450	460	470	480
CCCCAACTCA	CACAACAAC	CTTCCGCTGA	GAGGAGACAG	CCAGTGCGAC	TCCACCCCTCC
490	500	510			
AGCTCGACGG	CAGCCGCCCC	GGCCGAGAGC	CCCGA		

## ENCHAINEMENT XXXV

10	20	30	40	50	60
GTCCGAGTGCT	GTGTTTCAGTT	TTGGGCCCCCT	CACTACAAGA	CATCGAGGCC	ATGGAGTGTTG
70	80	90	100	110	120
TCCAGAGAGAG	GGCACGAGGT	GGTGAGGAGT	CTGGAGCACACA	TGTTTTATTG	GAAGCAGCTG
130	140	150	160	170	180
AGGAAAGTTGG	GATTGTTTCAG	TCCGGGAGAGG	CTCAGGGGAAA	ACATTATTGC	TCCTTTAAAAA
190	200	210	220	230	240
TCCCTGGAAG	GAGGTTGTGG	TGAGGTGGAG	GTCGGCCCTCT	GCTCCCAGGT	ATCAGTGATA
250	260	270	280	290	300
GGATGAGAGG	GAACTGTCTT	AAATTATGCC	AGGGGAGTTT	CAGTTTGGAT	ATCAGGGAACA
310	320	330	340	350	360
ATTTTTTTTC	TCCAAAAAAT	TGGTGAGGTA	CTGCCACACAGT	CTGCCCCAGCG	AGGTGGAATC
370	380	390	400	410	420
ACCATCCCTG	GAGATGTTCA	GGAACGTTGT	AGATGTGGCA	CTGAGGGGATG	TGGTTTAGTG

## ENCHAINEMENT XXXV (suite)

430 AGAATGGTAG GGATGGGTTG ATGGTTGGAC TAGATTAGCT TAGCGATCTT TCCAGTCATA 480  
490 ACGATCCTGT GATCCTACGA TCCTAAGGCG CCGGCCCCCAG CGGAGCAGAC CCGCAGGCTT 540  
550 CAGCCCCGGA GCCCCGGCCG CGCGTCGGGA CGCGGGCAGG GCCGGGCACC GCCGGGCAGG 600  
610 TGGCGGAGCA CAACGGGGAG CGGAGCGTAG GGCCCTGCCC GGCTCCAGCT CCCC GCCCTCC 660  
670 680 690 700 710 720  
GTCCCGCGCT GCCGGTGGCG GGGCGTGAGG AGGGGGGGCG GGGGGGGGGG GTCCCTACCG  
730 740 750 760 770 780  
GCCCTCTATAT AAGCGGCCGC AATGGCTTTG CCGCCAGAGC CGAGCGGCGC GGCGGGTCAG  
790  
ACGGCCGGGA CT

## REVENDICATIONS

1/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSCC) avec une ou plusieurs séquences du gène nox de poule dont l'ADNc présente l'enchaînement de nucléotides (I) et plus spécialement avec l'enchaînement (II).

2/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes de la revendication 1, avec au moins une partie du deuxième exon du gène nox de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

3/ Séquences de nucléotides selon la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine renfermant une séquence ayant une homologie d'au moins 70 % avec le fragment de protéine correspondant au deuxième exon du gène nox de poule, ce fragment présentant la séquence d'acides aminés (IV).

4/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique étant représentée sur la figure 2A.

5/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une séquence d'acides aminés présentant l'enchaînement V.

5

6/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie du l'enchaînement nucléotidique (VI), plus spécialement de l'enchaînement (VII).

10

7/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

15

8/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 70 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène nov de poule répondant à la séquence (IX).

20

25

9/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7 ou 8, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question étant représentées sur la figure 2A.

30

35

10/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisées en ce qu'elles

comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) en acides aminés.

5                   11/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XII).

10                   12/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes données dans la revendication 1, avec au moins une partie du quatrième exon  
15 du gène *nox* de poule, qui comprend l'enchaînement (XIII).

                  13/ Séquences de nucléotides selon la revendication 12, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une  
20 homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine potentiel correspondant au quatrième exon du gène *nox* de poule répondant à l'enchaînement (XIV) en acides aminés.

25                   14/ Séquences de nucléotides selon la revendication 12 ou 13, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XV) en acides aminés.

30                   15/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XVI).

35                   16/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du

premier exon du gène nox de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XVIII).

17/ Séquences de nucléotides selon la  
5 revendication 11, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 30 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au premier exon du gène nox de poule, ce fragment présentant l'enchaînement (XIX)  
10 en acides aminés.

18/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une  
15 protéine ayant la séquence (XX) en acides aminés.

19/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement  
20 nucléotidique (XXI).

20/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies  
25 dans la revendication 1, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène nox de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

21/ Séquences de nucléotides selon la revendication 20, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIII) en acides aminés.  
30

22/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 21, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième  
35



exon du gène nox de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XXII).

5 23/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène nox de poule répondant à la séquence  
10 (XXIII) en acides aminés.

24/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une  
15 protéine ayant la séquence (XXIV) en acides aminés.

25/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 24, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement  
20 nucléotidique (XXV), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XXVI).

26/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisées en ce qu'elles sont  
25 formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes données dans la revendication 1 avec au moins une partie du quatrième exon du gène nox de poule, qui comprend l'enchaînement de nucléotides (XXVII).

30 27/ Séquences de nucléotides selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine  
35 potentiel correspondant au quatrième exon du gène nox de poule répondant à l'enchaînement (XXVIII) en acides aminés.

28/ Séquences de nucléotides selon la revendication 26 ou 27, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIX) en acides aminés.

5

29/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XXX).

10

30/ Les ARN et séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 29.

31/ Vecteurs recombinants de clonage et d'expression, capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans la cellule hôte.

20

32/ Souches de microorganismes transformées ou transfectées, caractérisées en ce qu'elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 ou encore un vecteur recombinant selon la revendication .

25

33/ Les protéines correspondant aux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 30.

30

34/ Les anticorps polyclonaux et monoclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement une protéine selon la revendication 33, ou un fragment d'une telle protéine.

35

35/ Sonde de détection, caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 30.

36/ Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuell dans un échantillon biologique de séquences de nucléotides complémentaires de celles selon l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique avec une sonde nucléotidique selon la revendication 35 dans  
10 des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,

- la détection du complexe d'hybridation, et  
15

- le cas échéant l'amplification, avant l'étape de mise en contact, des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 susceptibles d'être  
20 contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et, d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides,

37/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle dans un échantillon biologique de séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18  
25 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 35,  
30

- un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde, et, avantageusement,  
35

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

5                   38/ Procédé de dépistage in vitro de la présence dans un échantillon biologique des protéines selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

10                   - la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 34, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie des protéines et cet anticorps, et

15                   - la détection du complexe immunologique.

20                   39/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle de protéines selon la revendication 21 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

25                   - une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 33,

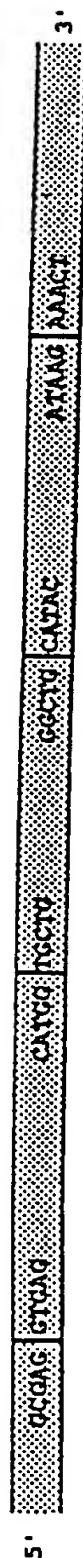
30                   - avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie d'une protéine et l'anticorps et, avantageusement,

35                   - des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine recherchée et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

40                   / Procédé de détection dans un échantillon biologique de protéines selon la revendication 33, ou de leurs fragments, caractérisé par la mise en contact des protéines de l'échantillon, ou de leurs fragments, avec un IGF portant un groupe marqueur et le dosage de la quantité de produit fixé.

- 5 41/ Utilisation en tant qu'amorces dans des techniques d'amplification d'ADN, de type PCR, de deux amplimères d'environ 15 nucléotides, compris dans l'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, et distantes de 200 à 250 nucléotides environ, l'une des séquences étant capable de se lier à l'extrémité 5' d'un brin de la séquence à amplifier et la deuxième séquence à l'extrémité 3' de l'autre brin.

FIGURE 1

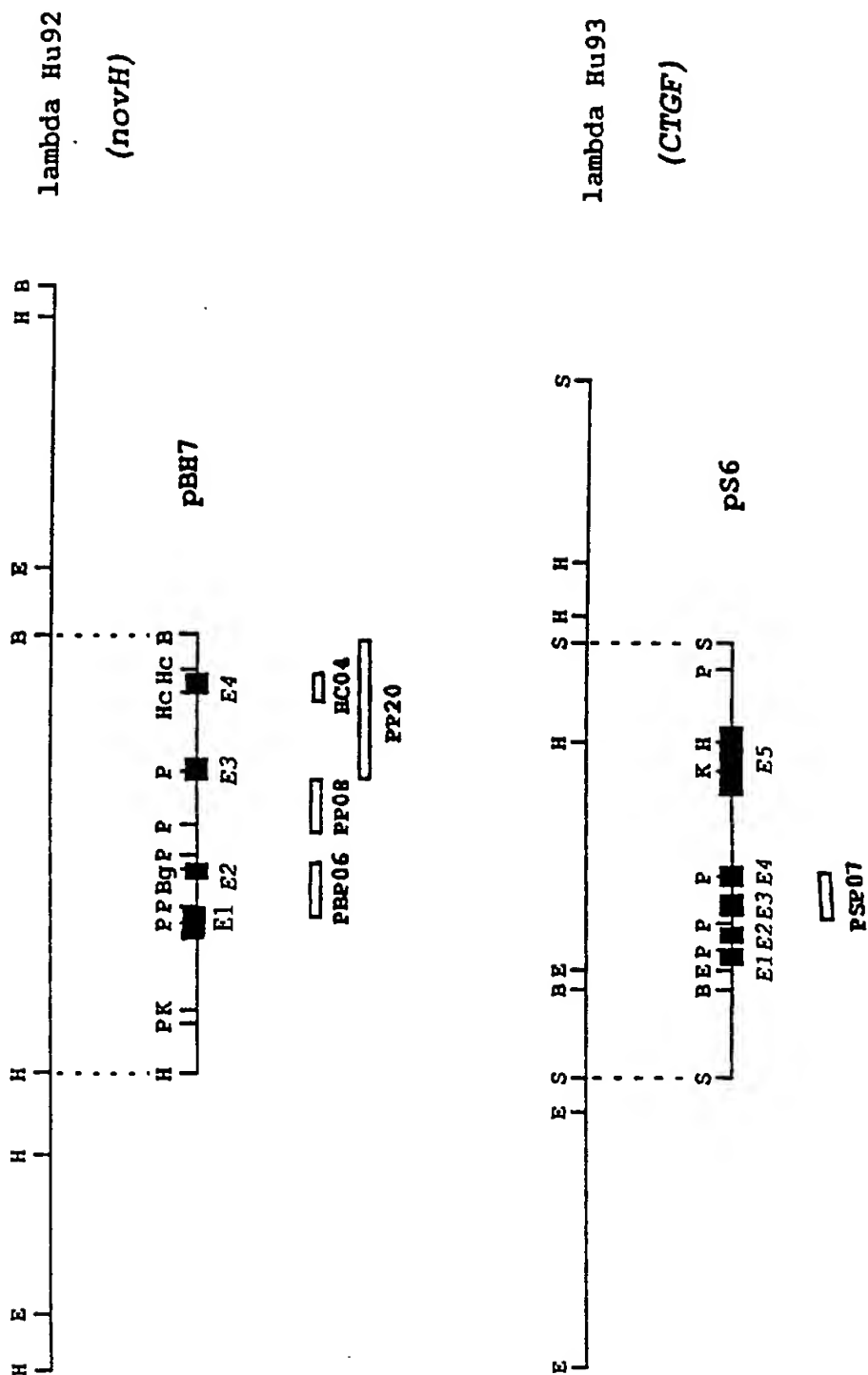


nov mRNA

[illegible]



FIGURE 2





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00589

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5: C12N15/12; C07K15/00; C12P21/08; C12Q1/68  
C12N1/21; G01N33/53; G01N33/574; C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5: C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES vol. T313, No. III, September 1991, PARIS, FRANCE pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL 'Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' see the whole document	1-41
O,X	Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Vol. 32 see page 312, abstract No. 1857 & 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al.	1-41
	-/-	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 1992 (16.10.92)

Date of mailing of the international search report

2 November 1992 (02.11.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00589

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, No. 1, January 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' see the whole document</p> <p>-----</p>	1-41

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale

PCT/FR 92/00589

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB	
CIB 5 C12N15/12; C12N1/21;	C07K15/00; G01N33/53;
C12P21/08; G01N33/574;	C12Q1/68 C12P19/34
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>	
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>	
Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté	
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>	
Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>
P,X	<p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES vol. T313, no. III, Septembre 1991, PARIS, FRANCE pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL 'Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>
O,X	<p>Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Vol. 32 voir page 312, Abrégé No. 1857 &amp; 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al.</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>	
<b>IV. CERTIFICATION</b>	
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p style="text-align: center;">16 OCTOBRE 1992</p>	<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">02. 11. 92</p>
<p>Administration chargée de la recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</p>	<p>Signature du fonctionnaire autorisé</p> <p style="text-align: center;">VAN PUTTEN A.J.</p>

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA  
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, <sup>15</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
P, X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, no. 1, Janvier 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' voir le document en entier -----	1-41